

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

09. 7. 2004

REC'D 02 SEP 2004

WIPO

PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application: 2003年 6月20日

出願番号
Application Number: 特願2003-175722
[ST. 10/C]: [JP 2003-175722]

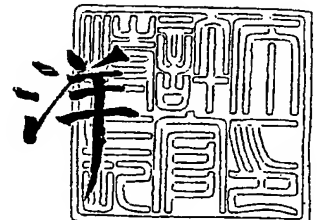
出願人
Applicant(s): 参天製薬株式会社

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年 8月19日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小川



BEST AVAILABLE COPY

【書類名】 特許願

【整理番号】 P030218

【提出日】 平成15年 6月20日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 A61K 38/00

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府富田林市藤沢台3丁目5-2-208

【氏名】 小崎 俊司

【発明者】

【住所又は居所】 兵庫県川辺郡猪名川町白金1丁目89番3号

【氏名】 杉本 央

【発明者】

【住所又は居所】 奈良県生駒市高山町8916-16 参天製薬株式会社
内

【氏名】 嶋澤 雅光

【発明者】

【住所又は居所】 奈良県生駒市高山町8916-16 参天製薬株式会社
内

【氏名】 原 英彰

【特許出願人】

【識別番号】 000177634

【氏名又は名称】 参天製薬株式会社

【代理人】

【識別番号】 100083149

【弁理士】

【氏名又は名称】 日比 紀彦

【選任した代理人】

【識別番号】 100060874

【弁理士】

【氏名又は名称】 岸本 瑛之助

【選任した代理人】

【識別番号】 100079038

【弁理士】

【氏名又は名称】 渡邊 彰

【選任した代理人】

【識別番号】 100069338

【弁理士】

【氏名又は名称】 清末 康子

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 189822

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 筋緊張亢進性疾患の治療剤

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 A 型ボツリヌス毒素の M 体（H A 陰性体）を有効成分とする神経筋伝達阻害剤。

【請求項 2】 A 型ボツリヌス毒素の M 体（H A 陰性体）を有効成分とする筋緊張亢進に起因する疾患の治療剤。

【請求項 3】 筋緊張亢進に起因する疾患が、斜視、眼瞼痙攣、片側顔面痙攣、痙性斜頸、局所性ジストニーまたは皺である請求項 2 記載の治療剤。

【請求項 4】 A 型ボツリヌス毒素の M 体の分子量が、200000～400000であることを特徴とする請求項 2 記載の治療剤。

【請求項 5】 A 型ボツリヌス毒素の M 体が、Clostridium botulinum type A 7I03-H、Clostridium botulinum type A Chiba-H または Clostridium botulinum type A Kyoto-F の菌株から産生されることを特徴とする請求項 2 記載の治療剤。

【請求項 6】 剤型が、注射剤である請求項 2～5 の治療剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、A 型ボツリヌス毒素の M 体を有効成分とする筋緊張亢進に起因する疾患の治療剤に関し、特に斜視、眼瞼痙攣、顔面痙攣、痙性斜頸、局所性ジストニー、皺の治療剤に関する。

【0002】

【従来の技術】

ボツリヌス菌は、偏性嫌気性のグラム陽性桿菌であり、ボツリヌス菌によって産生される毒素は末梢神経終末部に高い親和性を有し、全身骨格筋の弛緩性麻痺を主症状とするボツリヌス中毒症を惹き起こすことが知られている。

【0003】

ボツリヌス菌が産生する毒素は、抗原性の違いにより A～G までの 7 つに分類

され、さらに神経毒素に結合する無毒性タンパク質の構造の相違によってM体、L体およびLL体に分けることができる。特許文献1には、M体、L体およびLL体を含むボツリヌス毒素の液を、ラクトースカラムに通すことによって血球凝集活性を示さないM体（hemagglutinin陰性体：HA陰性体）と血球凝集活性を示すL体およびLL体（hemagglutinin陽性体：HA陽性体）に分離できることが記載されている。

【0004】

A型ボツリヌス毒素には、神経毒素に血球凝集活性を示さない無毒成分が結合した分子量約30万のM体（HA陰性体）、M体に血球凝集活性を示す無毒成分が結合した分子量約50万のL体（HA陽性体）および2つのL体が会合した分子量約90万のLL体（HA陽性体）の三種類が存在することが知られている。

【0005】

ところで、斜視は拮抗筋間の緊張バランスが破綻することによって生じ、眼瞼痙攣は眼輪筋の不随意収縮により開眼が困難になる病態であり、また、顔面痙攣は顔面神経の被刺激性亢進により顔面筋が不随意に収縮する疾患である。皺は、筋肉の収縮により生じ、顔面の皺としては、例えば眉間の皺、目尻の皺、鼻根部の皺などがある。このように、斜視、眼瞼痙攣、顔面痙攣、痙攣性斜頸、局所性ジストニー、皺は、いずれも局所性の筋緊張亢進作用が原因となっている。

【0006】

ボツリヌス毒素を筋緊張亢進に起因する疾患の治療に利用するものとしては、例えば、非特許文献1ではボツリヌス毒素が斜視の治療に用いられ、また、非特許文献2では眼瞼痙攣の治療に用いられている。特許文献2には、ボツリヌス毒素を臨床的応答の低下が生じるまで投与し、その後に、他のボツリヌス毒素を投与して神経筋疾患を処置する方法が開示されている。特許文献3には、A～G型のボツリヌス毒素のうちの少なくとも2種を組み合わせることで投与することにより神経筋疾患を処置する方法が開示されている。非特許文献3には、ボツリヌス毒素が眉間の皺の治療に有効であることが報告されている。

【0007】

しかしながら、上記いずれの文献にも、A型ボツリヌス毒素のM体（HA陰性

体)を斜視、眼瞼痙攣、皺などの筋緊張亢進に起因する疾患の治療に適用することは、全く記載されておらず、示唆もされていない。

【0008】

【特許文献1】

特開 2003-9897号公報

【0009】

【特許文献2】

特表平 8-511536号公報

【0010】

【特許文献3】

特表平 8-511537号公報

【0011】

【非特許文献1】

Ophthalmology, 87, 1044-1049(1980)

【0012】

【非特許文献2】

J. Fr. Ophthalmol., 13, 259-264(1990)

【0013】

【非特許文献3】

Therapy with botulinum toxin, Marcel Dekker, New York, 1994, p.577-595.

【0014】

【発明が解決しようとする課題】

ボツリヌス毒素は、筋緊張を緩和する薬物として知られているが、それ自体毒性の強い薬物である。したがって、ボツリヌス毒素は、その副作用として筋緊張緩和による全身倦怠感などを来すことがあり、とりわけ、使用量を誤ると重篤な副作用を来すので、ボツリヌス毒素の投与量を可能な限り少なくすることが望まれている。

【0015】

【問題を解決するための手段】

本発明者らは、A型ボツリヌス毒素の構成成分（M体、L体、LL体）に着目して鋭意研究を重ねた結果、神経毒素に血球凝集活性を示さない無毒成分が結合した分子量約30万のM体（HA陰性体）は、M体に血球凝集活性を示す無毒成分が結合した分子量約50万のL体および分子量約90万のLL体の混合物（HA陽性体）よりも優れた神経筋伝達阻害活性を有することから、A型ボツリヌス毒素のM体が筋緊張亢進に起因する疾患の治療剤として特に有用であることを見出し、本発明に至った。

【0016】**【発明の実施の形態】**

本発明は、A型ボツリヌス毒素のM体（HA陰性体）を有効成分とする神経筋伝達阻害剤、すなわち筋緊張亢進に起因する疾患の治療剤である。

【0017】

本発明のA型ボツリヌス毒素のM体は、優れた神経筋伝達阻害活性を有するので、斜視、眼瞼痙攣、顔面痙攣、痙性斜頸、局所性ジストニー、皺などの筋緊張亢進に起因する疾患の治療剤として有用である。皺としては、例えば顔面筋の収縮によって生じる眉間の皺、目尻の皺、鼻根部の皺、おとがい部の皺などの顔面の皺が挙げられる。

【0018】

詳細は薬理試験の項で述べるが、筋張力試験を実施することにより、A型ボツリヌス毒素のM体（HA陰性体）の神経伝達阻害活性を評価した。この試験ではマウスの横隔膜・横隔神経標本を用い、比較対照薬物としてA型ボツリヌス毒素のL体およびLL体の混合物を用いた。比較試験は同一モル比で実施するのが標準的であるが、L体およびLL体の混合物の分子量を特定するのが困難であったので、毒素の生物活性（力価）を基準とした。即ち、毒素の力価はi.p.LD₅₀値（腹腔内投与における50%致死量）で表すことができ、そのi.p.LD₅₀値が同一となる量で試験した。その結果、M体は、L体およびLL体の混合物と同一力価のものをを用いたにもかかわらず、L体およびLL体の混合物に比べて約10倍もの神経伝達阻害活性を発揮することが判明した。同一力価の毒素では、同一の

効果を発揮すると予測されるのが通常であるが、本知見はその予測を全く覆すものである。以上のことから、A型ボツリヌス毒素のM体は、L体およびLL体の混合物の約1/10の力価でも同等な神経伝達阻害効果を示すので、その投与量を大幅に減らすことが可能となる。

【0019】

本発明のA型ボツリヌス毒素のM体は、*Clostridium botulinum* type Aのうち、7I03-H、7I05-H、Chiba-H、Kyoto-F、804-1HなどのHA陽性体を産生しない菌株を用いて培養すれば、A型ボツリヌス毒素のM体だけを産生することができるので、L体およびLL体を分離する手間を省くことができる。また、M体、L体およびLL体を含むボツリヌス毒素液をイオン交換カラム、ゲルろ過カラムに通すことにより、血球凝集活性を示さないM体だけをこれらの混合物から単離することもできる。

【0020】

A型ボツリヌス毒素のM体は、血球凝集活性を示さず(HA陰性)、その分子量は200000～400000の範囲にある。これに対して、A型ボツリヌス毒素のL体およびLL体は、血球凝集活性を示し(HA陽性)、その分子量は500000以上である。したがって、A型ボツリヌス毒素のM体は、そのL体およびLL体と明確に区別できる。

【0021】

本発明のA型ボツリヌス毒素のM体の投与量は、対象疾患により適宜選択することができ特に制限されないが、毒素による副作用に配慮すると、治療一回あたり0.01～500単位/部位であることが好ましく、より好ましくは0.5～300単位/部位である。

【0022】

本発明の筋緊張亢進に起因する疾患の治療剤は、ボツリヌス毒素の作用部位である筋肉に投与することが好ましい。その投与剤型は、主に注射剤であり、汎用されている技術を用いて製剤化することができる。

【0023】

本発明の注射剤は、塩化ナトリウムなどの浸透圧調整剤、リン酸ナトリウムな

どの緩衝剤等の添加剤を加えて、調製することができる。

【0 0 2 4】

本発明の注射剤の pH は 4 . 0 ~ 7 . 5 に設定することが好ましく、また、浸透圧比を 1 . 0 付近に設定することが好ましい。

【0 0 2 5】

本発明の筋緊張亢進に起因する疾患の治療剤は、通常行なわれている筋肉内注射を用いればよい。

【0 0 2 6】

以下に製造例、薬理試験および製剤例を示すが、これらの実施例は、本発明をよりよく理解するためのものであり、本発明の範囲を限定するものではない。

【0 0 2 7】

【実施例】

1 . 試験用毒素の製造

A 型ボツリヌス毒素の試験用毒素は、阪口の方法 (Sakaguchi, G. (1983) Clostridium botulinum toxins. Pharmac Ther. 19, 165-94) に一部変更を加えて製造した。

【0 0 2 8】

(1) 製造例 1 (M 体毒素の製造)

凍結保存されている Clostridium botulinum type A 7I03H 株 (「M 体毒素」の産生株) の芽胞菌液を前培養培地 (Cooked Meat 培地) に接種して、30℃ で 2 日間培養した。この前培養培地をペプトン-酵母抽出物-グルコース培地 (PYG 培地) に接種して、30℃ で 3 日間培養した。

【0 0 2 9】

つぎに、この培養液に 3N-H₂SO₄ を加えて酸沈殿を行った後、pH を 3.5 に調整して一晩室温で静置した。翌日、遠心分離 (9200×g、20 分、4℃) して得られた沈殿に 0.2M-リン酸緩衝液 (pH 6.0) を加えて溶解させた。

【0 0 3 0】

溶解液の pH を 6.0 に調整し、37℃ で 1 時間混和し毒素を抽出した。抽出液を遠心分離 (9200×g、20 分、4℃) し、その上清を採取し、2 % のプロタミンを含

有する0.2M-リン酸緩衝液 (pH6.0) を加えて沈殿を得た。これを遠心分離 (9200 × g、15分、4℃) し、上清を得た。ついで、この上清に飽和硫酸 (390g/L) が60% (w/v) となるように加え、4℃で一晩静置して塩析を行った。翌日、遠心分離 (9200 × g、15分、4℃) を行い、沈殿を0.05M-酢酸緩衝液 (pH4.2、0.2M-NaCl) に溶解させ、その溶液を透析膜に入れ、0.05M-酢酸緩衝液 (pH4.2、0.2M-NaCl) で一晩透析した。透析終了後遠心分離 (13700 × g、15分、4℃) して、その上清を0.05M-酢酸緩衝液 (pH4.2、0.2M-NaCl) で平衡化したイオン交換カラム [SP-Sep harose Fast Flow (アマシャム社)] に供した。最終的に0.05M-酢酸緩衝液 (pH4.2、0.7M-NaCl) となるようにリニアグラジエントをかけて不純物及び毒素を溶出させた。

【0031】

毒素画分は、フラクションコレクターで採取し、毒力測定、OD値、電気泳動像をもとに「M体毒素」として集める部分を決定した。集められたフラクションは、限外ろ過 (アミコンYM30) を用いて濃縮し、純度を上げるために、この濃縮液を0.05M 酢酸緩衝液 (pH6.0、0.2M-NaCl) で平衡化したゲルろ過カラム [Sephad ex G-200 (ファルマシア社)] に通して、毒素フラクションを集め、限外ろ過 (アミコンYM30) を用いて濃縮し、薬理試験用のA型ボツリヌス毒素である「M体毒素」の原液 (蛋白質濃度1.78mg/ml、生物活性 2.0×10^7 i.p.LD₅₀/ml) を得た。なお、生物活性 (力価) は、マウスへ腹腔内投与後の50%死亡率 (i.p.LD₅₀) を指標とするものである。

【0032】

(2) 製造例2 (L体毒素及びLL体毒素の混合物の製造)

Clostridium botulinum typeA 7I03H株の代わりに*Clostridium botulinum* typ eA 62A株 (「M体毒素、L体毒素およびLL体毒素の混合物」の産生株) を用いて、製造例1と同様の操作を行って、薬理試験用のA型ボツリヌス毒素である「L体毒素及びLL体毒素の混合物」の原液 (蛋白質濃度1.99 mg/ml、生物活性 1.3×10^7 i.p.LD₅₀/ml) を得た。なお、毒素画分は、フラクションコレクターで採取し、毒力測定、OD値、電気泳動像をもとに「L体毒素及びLL体毒素の混合物」として集める部分を決定した。

【0033】

2. 薬理試験（マウス横隔膜・横隔神経標本の筋張力試験）

「M体毒素」および「L体毒素及びLL体毒素の混合物」について、薬理活性を比較するために、マウス（系統：ddY、性別：雄性）の横隔膜・横隔神経標本を用いた筋張力試験を実施した。

【0034】

（被験液の調製）

製造例1のM体毒素を0.02%ウシ血清アルブミンを含む20mM-トリス塩酸塩緩衝液（pH7.4、150mM-NaCl）で希釈することによって、被験液（ 3.4×10^5 i.p.LD₅₀/ml）を調製した。

【0035】

（比較液の調製）

製造例2のL体毒素及びLL体毒素の混合物を0.02%ウシ血清アルブミンを含む20mM-トリス塩酸塩緩衝液（pH7.4、150mM-NaCl）で希釈することによって、比較液（ 5.5×10^5 i.p.LD₅₀/ml）を調製した。

【0036】

（測定方法）

マウスにペントバルビタール（50mg/kg）を腹腔内投与し、安楽死させた後、胸郭を開いて、左右の横隔神経を胸腺の高さで結紮した。左右の横隔神経を横隔膜に至るまで周囲の結合組織から丁寧に剥離した後、腹腔側にも切開を加えて、横隔膜と第十二肋骨を一体として横隔神経が付着したままの状態に摘出した。摘出した横隔膜・横隔神経標本を37℃に保温した水槽中で半切し、各々の横隔膜半片を第十二肋骨に通した絹糸で組織支持装置に固定した。

【0037】

つぎに、横隔神経を白金電極輪に通した後、横隔膜標本を37℃に保温した組織浴槽に移した。一端を横隔膜中心腱に結紮した絹糸の他端を等尺張力トランスデューサーに接続して、横隔膜・横隔神経標本をKrebs液中に懸垂した。白金電極輪から電圧1Vで持続時間10msecの矩形波を0.25Hzの頻度で横隔神経に加え、神経に対する電気刺激で誘発される横隔膜の収縮張力を張力アンプで増幅し、経時

的にペンレコーダーに記録した。横隔膜・横隔神経標本に約4gの安静時負荷をかけ、15～20分毎に組織浴槽中のKrebs液を交換しながら誘発張力および基線が安定するまで1～2時間無処理のまま観察した。

【0038】

基線および張力が安定していることを確認した後、被験液および比較液をそれぞれ組織浴槽のKrebs液に添加し、誘発張力の毒素による減衰を記録した。実験終了後に、各々の横隔膜・横隔神経標本について張力を解析した。毒素作用による張力の減衰の指標として、毒素添加時から、誘発張力が毒素処理直前の誘発張力に対して $1/e$ にまで減衰する時間、即ち、経時的に記録した収縮張力をプロットし、近似曲線を求めることによって、横隔神経・横隔膜標本の収縮張力が、毒素処理前の収縮張力の $1/e$ まで減弱するのに要する毒素処理時間 (τ) を求め、これを神経筋伝達阻害活性の指標とした（なお、神経筋伝達阻害活性は、 τ 値が小さいほどが大きくなる。）。これらの結果から、図1に、被験液、比較液を用いたときのマウス致死作用と神経筋伝達阻害活性の関係を示し、また、表1に、同一マウス致死作用量において被験液の神経筋伝達阻害活性を1とした場合の比較液の阻害活性を示す。なお、図中の被験液の各プロットは4～5例の平均値を、また、比較液の各プロットは2～3例の平均値を示す。

【0039】

【表1】

	神経筋伝達阻害活性
被験液	(1.00)
比較液	0.10

【0040】

(結果および考察)

図1から明らかなように、横隔神経に対する電気刺激によって横隔膜に誘発される収縮張力は、いずれの毒素についても経時的に減衰し、収縮張力の減衰は指数関数曲線に良く一致している。表1より、M体毒素の神経筋伝達阻害活性は、L体毒素及びLL体毒素の混合物の約10倍である。

【0041】

3. 製剤例

注射剤

本発明の注射剤の一般的な製剤例を以下に示す。

【0042】

処方1 (100mL中)

A型ボツリヌス毒素のM体	1000単位
ヒト血清アルブミン	75mg
生理食塩水	適量

【0043】

【発明の効果】

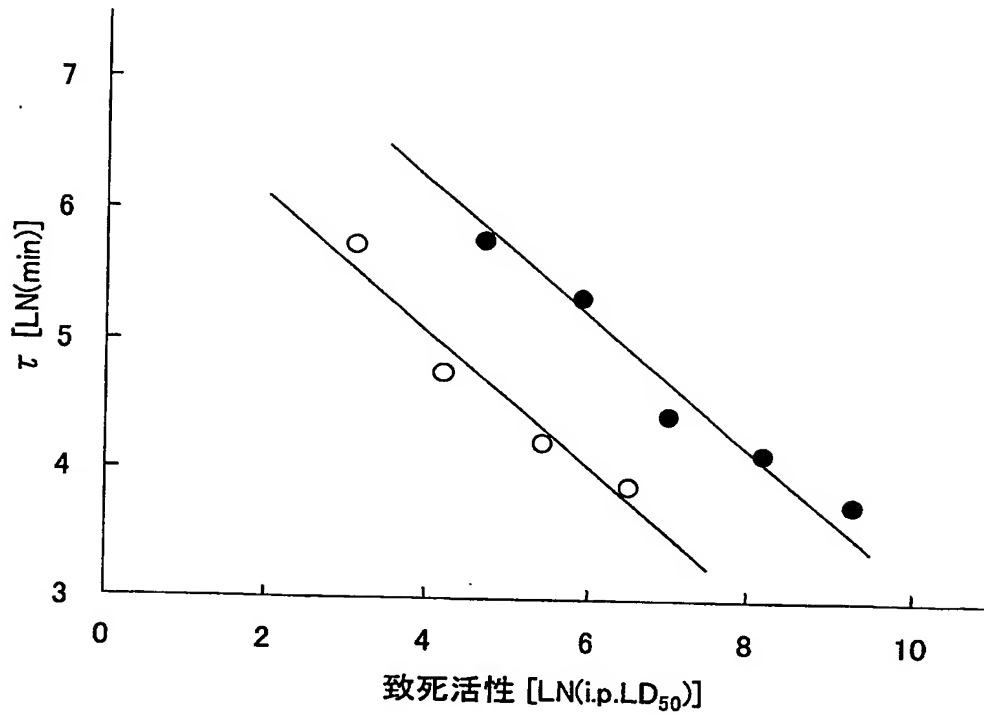
A型ボツリヌス毒素のM体(HA陰性体)は、L体及びLL体(HA陽性体)の混合物よりも優れた神経筋伝達阻害作用を有するので、斜視、眼瞼痙攣、片側顔面痙攣、痙攣性斜頸、局所性ジストニー、皺などの筋緊張亢進に起因する疾患の治療剤として有用である。

【図面の簡単な説明】

【図1】 図1は、被験液、比較液を用いたときのマウス致死活性と神経筋伝達阻害活性の関係を示す。

【書類名】 図面

【図 1】



○ : 被験液 (M体毒素)

● : 比較液 (L体毒素及びLL体毒素の混合物)

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 A型ボツリヌス毒素のM体とL体およびL L体の混合物の神経筋伝達阻害活性を比較検討すること。

【解決手段】 A型ボツリヌス毒素のM体は、L体およびL L体の混合物よりも神経筋伝達阻害活性に優れているので、斜視、眼瞼痙攣、顔面痙攣、皺などの筋緊張亢進に起因する疾患の治療剤として有用である。

【選択図】 なし

特願 2 0 0 3 - 1 7 5 7 2 2

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[0 0 0 1 7 7 6 3 4]

1. 変更年月日

1 9 9 0 年 8 月 6 日

[変更理由]

新規登録

住 所

大阪府大阪市東淀川区下新庄 3 丁目 9 番 1 9 号

氏 名

参天製薬株式会社